

Raccomandazioni per l'ottimizzazione della fase pre-analitica per una corretta determinazione della glicemia in ambito diabetologico

Graziella Bonetti¹, Mariarosa Carta², Annunziata Lapolla³, Roberto Miccoli⁴, Roberto Testa⁵, Andrea Mosca⁶ (in qualità di delegati SIBioC, SIPMeL e SID) e per il GdS SIBioC-SIPMeL Diabete mellito

¹ U.O.C. Laboratorio Centrale Analisi Chimico-Cliniche, ASST- Spedali Civili, Brescia

² Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza

³ Dip. di Medicina, Università degli Studi, Padova

⁴ Dip. di Medicina Clinica e Sperimentale, Sez. Diabetologia e Malattie Metaboliche, Università degli Studi, Pisa

⁵ Lab. analisi chimico-cliniche e molecolari, INRCA, Ancona

⁶ Dip. di Fisiopatologia medico-chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi, Milano

Premessa

La misura della glicemia a digiuno o dopo carico orale di glucosio è uno dei punti chiave della diagnosi di diabete e/o di alterata regolazione glicemica, e riveste inoltre un ruolo fondamentale anche nel monitoraggio del paziente diabetico (1, 2). Una glicemia accurata rappresenta anche uno dei parametri della classificazione del paziente (insieme ai marker di autoimmunità e al peptide C), oltre che della gestione clinica insieme alla misurazione della HbA_{1c}.

La fase pre-analitica può essere però causa di numerosi problemi. Il prelievo per la glicemia deve essere eseguito alla mattina (3) dopo un digiuno di 8-12 ore (4). Il soggetto non deve presentare infezioni, febbre o aver subito recenti ospedalizzazioni se il prelievo viene eseguito per screening. L'assunzione di alcool e caffè deve essere evitata, così come il fumo di sigaretta, lo stress e gli sforzi fisici eccessivi (5) nei momenti che precedono il prelievo ematico.

Di fondamentale importanza è comunque la scelta dell'anticoagulante e del tipo di campione da analizzare. Esistono infatti significative differenze nei risultati ottenuti su campioni diversi (sangue intero, plasma, sangue capillare, siero). Le principali società scientifiche ed organismi professionali raccomandano di eseguire il dosaggio della glicemia su plasma; la provetta andrebbe però posizionata in un bagno di acqua e ghiaccio fondente e centrifugata entro 30 minuti, oppure centrifugata immediatamente dopo il prelievo ed il plasma separato dalla parte corpuscolata (6). Questi accorgimenti sono necessari per bloccare la glicolisi che procede in-vitro dopo il prelievo di sangue e che determina una diminuzione della glicemia pari al 6-7% all'ora.

Tuttavia spesso l'organizzazione dei laboratori non consente una rapida centrifugazione dei campioni. E' necessario allora ricorrere all'utilizzo di anticoagulanti in grado di inibire gli enzimi della glicolisi. Tra i più utilizzati ancora oggi a questo scopo vi è il fluoruro di sodio (NaF) che però inibisce un enzima situato nella parte distale della glicolisi, l'enolasi. Gli enzimi posizionati nella parte iniziale della via glicolitica restano attivi, la fosforilazione dei glucidi continua finché l'ATP non si esaurisce e questo causa un consumo del glucosio. Quindi, anche in presenza di NaF, il blocco della glicolisi non avviene nelle prime 2 ore dalla raccolta del campione, come dimostrato da numerosi studi. Infatti, la concentrazione del glucosio diminuisce gradualmente e la sua stabilizzazione si ha solo dopo 90-120 minuti dal prelievo (7).

E' stato quindi proposto l'utilizzo di provette contenenti tampone citrato: l'acidificazione del campione blocca istantaneamente l'esochinasi e la fosfofruttochinasi, enzimi che agiscono precocemente nella via glicolitica (8). Anche se viene riportato un lieve decremento della glicemia dopo 24 ore (9), è stato descritto in recenti studi come tale inibizione possa durare fino a 96 h a temperatura ambiente (10).

L'utilizzo di provette contenenti acido citrico e fluoruro di sodio (per garantire comunque una inibizione a lungo termine) è stato raccomandato dalla National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) nel 2011 in tutti quei casi in cui non può essere assicurata una pronta centrifugazione del campione (6), mentre l'utilizzo delle provette contenenti solo sodio fluoruro viene scoraggiato in quanto garantisce solo una inibizione tardiva della glicolisi. La miscela acidificata raccomandata dalla NACB era presente in forma liofila nelle provette FC Mixture della ditta Terumo, validate in numerosi studi (8-11), ma ora non più disponibili in commercio. Tale miscela è presente in forma liquida nelle provette GlucoEXACT di Sarstedt che inibiscono in maniera efficace e pronta la glicolisi (12). Tuttavia è necessario che la provetta venga riempita correttamente e che si utilizzi un opportuno fattore di conversione indicato dal produttore per correggere l'effetto di diluizione.

Recentemente la ditta Greiner ha proposto una provetta (FC-MIX Greiner) contenente tampone citrato e sodio fluoruro in forma liofila. La provetta con miscela ternaria acidificata è dedicata al dosaggio della glicemia. Questa provetta ha dimostrato una efficacia analoga alla provetta Terumo, ora non più disponibile, nello stabilizzare la glicemia fino a 48 ore (13). Il suo utilizzo è stato validato anche nell'esecuzione dell'OGTT nello screening del diabete gestazionale (14), confrontandole con le provette contenenti NaF-ossalato utilizzate nell'HAPo study, studio che è servito per stabilire i cut-off decisionali per la diagnosi di diabete gestazionale (15).

Sintesi delle raccomandazioni

Per lo screening e la diagnosi del diabete mellito, compreso il diabete gestazionale:

1. Il soggetto deve essere a digiuno da almeno 8 ore e non oltre le 12 ore. Non deve aver presentato di recente febbre, infezioni acute o aver subito recenti traumi o interventi chirurgici.
2. La determinazione della glicemia deve essere eseguita su plasma con metodo enzimatico.
3. Deve essere ottenuto un efficace blocco della glicolisi mediante l'impiego di uno dei seguenti metodi:
 - a. posizionando la provetta in acqua con ghiaccio fondente e centrifugandola entro 30 minuti, oppure
 - b. centrifugando immediatamente la provetta e separando il plasma dalla parte corpuscolata, oppure
 - c. impiegando, qualora i procedimenti e i tempi di cui sopra non possano essere rispettati, un anticoagulante in grado di svolgere una rapida e duratura inibizione della glicolisi (NaF, tampone citrato, EDTA), presente nelle provette FC-MIX Greiner oppure GlucoEXACT Sarstedt (in tal caso sarà applicato un opportuno fattore di conversione^a).
4. Nelle condizioni di cui sopra la glicemia è stabile per 48 ore a temperatura ambiente, 24 ore a 37°C e per 3 giorni a 4-6 °C.

Per la misura della glicemia ai fini del monitoraggio del controllo glicemico nel paziente con diabete noto si possono continuare ad utilizzare provette con LiHep con rapida centrifugazione ed analisi o siero con acceleratore della coagulazione e gel separatore.

^a Il fattore di correzione indicato sulle provette dall'azienda Sarstedt è 1.16.

Bibliografia

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2017;10 (Suppl 1):S11-24.
2. Standard Italiani per la cura del diabete mellito 2016. (www.standaditaliani.it).
3. Troisi RJ, Cowie CC, Harris MI. Diurnal variation in fasting plasma glucose. *JAMA* 2000;284:3157-9.
4. Statland BE, Winkel P. Response of clinical chemistry quantity values to selected physical, dietary, and smoking activities. *Prog Clin Pathol* 1981;8:25-44.
5. Guder WG, Narayanan S, Wisser H, Zawta B. *Samples: from the patient to the laboratory. The impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results.* 4thEdition 2009, Wiley-Blackwell, pag 6-14.
6. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS et al. Guidelines and recommendation for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2011;34:e61-9.
7. Gambino R. Sodium fluoride: an ineffective inhibitor of glycolysis. *Ann Clin Biochem* 2013;50:3-5.
8. Gambino R, Piscitelli J, Ackattupathil TA, Theriault JL, Reynaldo DA, Sanfilippo ML, Monina E. Acidification of blood is superior to sodium fluoride alone as an inhibitor of glycolysis. *Clin Chem* 2009; 55:1019-1021.
9. Fobker M. Stability of glucose in plasma with different anticoagulants. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:1057-60.
10. Winter T, Greiser A, Nauck M, Petersmann A. Long-term stability of glucose: 96-h study using Terumo Glycaemia tubes. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54:407-10.
11. Bonetti G, Carta M, Montagnana M, Lo Cascio C, Bonfigli AR, Mosca A., Testa R. Effectiveness of citrate buffer-fluoride mixture in Terumo tubes as an inhibitor of in vitro glycolysis. *Biochem Med* 2016;26:68-76.
12. Bonetti G, Cancelli V, Coccoli G, Piccinelli G, Brugnoli D, Caimi L, Carta M. Which sample tube should be used for routine glucose determination? *Prim Care Diabetes* 2016;10:227-32.
13. Bonetti G, Carta M. The new Greiner FC-Mix Tubes equal the old Terumo ones and are useful as glucose stabilizer after prolonged storage of samples. *Biochem Med* 2017;27:584-9.
14. van der Hagen EAE, Fokkert MJ, Kleefman AMD, Thelen MHM, van der Berq SAA, Slingerland RJ. Technical and clinical validation of the Greiner FC-Mix glycaemia tube. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1530-6.
15. HAPO Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2008;358:1991-2002.